

3

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
7 septembre 2001 (07.09.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/64945 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68, G01N 33/53

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/00604

(22) Date de dépôt international : 1 mars 2001 (01.03.2001)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :
00/02614 1 mars 2000 (01.03.2000) FR

(84) États désignés (regional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : NUCLE-ICA [FR/FR]; Biopôle Clermont Limagne, F-63360 Saint Beauzire (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : CAILLOUX, Fabrice [FR/FR]; 55 Boulevard Jean Jaurès, F-63000 Clermont-Ferrand (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Reginbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(54) Title: NOVEL DNA CHIPS

(54) Titre : NOUVELLES PUCES A ADN

(57) Abstract: The invention concerns a DNA chip system for detecting mutation in a target nucleic acid such that only the DNA comprising the mutation remains on the chip at the end of the process. The invention concerns a method which consists in adding a complementary αS-phosphothioatedesoxynucleotide of the mutation is added by means of DNA polymerase at the 3' end of the probe hybridised with the target nucleic acid and in adding an exonuclease so that only the elongated probes are not degraded. The detection of the presence or absence of mutation is carried out by directly or indirectly measuring the presence or the absence of DNA in a specific site on the chip. Advantageously, the chip comprises ISFET transistors or piezoelectric transducers.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un système de puces à ADN pour détecter une mutation dans une acide nucléique cible de manière à ce que seul l'ADN comportant la mutation demeure sur la puce à l'issu du procédé. L'invention concerne un procédé dans lequel un αS-phosphothioatedesoxynucléotide complémentaire de la mutation est ajouté au moyen d'une ADN polymérase à l'extrémité 3' de la sonde hybridée à l'acide nucléique cible et dans lequel une exonucléase est ajoutée de sorte que seules les sondes élongées ne sont pas dégradées. La détection de la présence ou de l'absence de la mutation est effectuée par mesure directe ou indirecte de la présence ou de l'absence d'ADN en un site donné sur la puce. Avantageusement, la puce comprend des transistors du type ISFET ou des transducteurs piézo-électriques.

WO 01/64945 A2

NOUVELLES PUCES A ADN

- 5 La présente invention se rapporte à un système de puces à ADN pour détecter une mutation dans un acide nucléique cible de manière à ce que seul l'ADN comportant la mutation demeure sur la puce à l'issu du procédé. L'invention concerne un procédé dans lequel un α S-phosphothioatedésoxynucléotide complémentaire de la mutation est ajouté au moyen d'une ADN polymérase à l'extrémité 3' de la sonde hybridée à l'acide nucléique cible et dans lequel une exonucléase est ajoutée de sorte que seules les sondes élongées ne sont pas dégradées. La détection de la présence ou de l'absence de la mutation est effectuée par mesure directe ou indirecte de la présence ou de l'absence d'ADN en un site donné sur la puce. Avantageusement, la puce comprend des transistors du type ISFET ou des transducteurs piézo-électriques.
- 10 Les mutations dans les cellules germinales ou dans les lignées somatiques peuvent avoir des conséquences redoutables sur l'organisme en provoquant par exemple des maladies génétiques héréditaires ou l'apparition de cancer. L'effet d'une mutation dépend étroitement de sa localisation dans l'ADN. Dans le cas d'une mutation dans une région codante, on peut observer la perte de la fonction de la protéine codée. Si la mutation se trouve dans une région régulatrice, l'expression de l'ADN peut être abolit ou augmenter. Une mutation dans un gène impliqué dans le cancer au niveau de la lignée germinale ne signifie pas obligatoirement que l'individu concerné contractera effectivement une tumeur, mais seulement que le risque de celle-ci est accru. En outre,
- 20 lorsque l'on cherche à diagnostiquer le potentiel invasif d'une tumeur déjà établie, on ne sait pas d'avance quelles mutations il faut attendre car celles-ci peuvent se trouver sur plusieurs gènes ou à plusieurs endroits d'un même gène. Dès lors, il apparaît nécessaire de pouvoir détecter simultanément de nombreuses mutations.
- 25 Le besoin en une technique de détection de mutations, de typage ou encore d'étude du polymorphisme se fait de plus en plus ressentir dans l'industrie soit pour permettre la
- 30

découverte de nouvelles cibles biologiques d'intérêts, soit pour connaître précisément le profil génétique d'une tumeur ou d'un patient et envisager des thérapies adaptées. Ce besoin a conduit au développement de diverses techniques telles que la LCR, la SSCP et la RFLP mais elles ne permettent pas une recherche systématique de nombreuses mutations au sein d'un échantillon.

L'objectif à la base de la présente invention a été de mettre au point une technique permettant la détermination simultanée de plusieurs nucléotides à identifier et par conséquent le diagnostic de mutations et de polymorphismes de gènes, ou l'identification de micro-organismes pathogènes ou génétiquement modifiés. Plus spécifiquement, le problème réside en une compilation de différentes techniques biochimiques, électroniques ou optiques au sein d'un même dispositif qui serait particulièrement facile d'utilisation, qui pourrait générer des signaux avec un faible ratio bruit/ signal sans pour autant nécessiter un traitement fastidieux et une interprétation compliquée. Il est également important de fournir un dispositif le plus intégré possible et de faible coût.

Les puces à ADN pourraient répondre aux problèmes précités, mais telles qu'elles sont proposées dans l'état de la technique, elles comportent des limites inhérentes qui freinent leur exploitation à grande échelle.

Une puce consiste en une multitude de sondes nucléiques fixées avec précision à des endroits définis sur un support solide se présentant sous la forme de surfaces planes ou poreuses composées de différents matériaux permettant une telle fixation. Jusqu'à présent, le choix du support était conditionné par sa capacité à permettre la fixation des sondes. Des matériaux comme le verre, le silicium ou des polymères sont couramment utilisés dans l'état de la technique. Les sondes sont greffées sur ces surfaces lors d'une première étape appelée « fonctionnalisation » dans laquelle on ajoute une couche intermédiaire de molécules réactives pour capter ou fixer les sondes.

Le verre est un matériau de choix puisqu'il est inerte, non polaire et mécaniquement stable. Il a été utilisé dans un procédé de synthèse *in situ* d'oligonucléotides par un adressage photochimique mis au point par la société Affymetrix. Cette technique consiste à utiliser une surface de verre activée par addition de silane portant des groupes NH₂ ou OH; Sheldon E.L. (1993) Clin. Chem. 39 (4), 718-719.

- 5 Une autre méthode consiste à recouvrir la surface de verre par de la poly-L-lysine, de déposer les sondes puis d'effectuer la greffe par exposition aux UV. On peut également citer les polymères tels que les polypyrroles développés par CIS Bio-international.

10

- Une fois les sondes attachées au support solide, on permet à l'ADN provenant d'échantillons de s'hybrider dans des conditions prédéfinies. La composition en base du duplex est un élément essentiel influençant sa stabilité qui dépend étroitement de la température de fusion (Tm). Lorsque l'on cherche à détecter des mutations ponctuelles, 15 les mésappariements entraînent une chute du Tm, ce qui a pour conséquence une élimination des acides nucléiques qui ne se sont pas totalement hybridées lors de l'étape de lavage. Ainsi, il quasiment impossible de rechercher à détecter simultanément plusieurs mutations dans plusieurs gènes d'intérêts car les Tm varient d'un duplex à l'autre. De plus, la longueur des sondes représentent une difficulté 20 technique non négligeable lorsque l'on souhaite détecter simultanément de nombreuses mutations à l'aide de différentes sondes de longueur différente.

- En ce qui concerne l'étape de détection des hybridations, l'utilisation de molécules fluorescentes, telles que la fluorescéine, constitue la méthode de marquage la plus 25 courante. Cette méthode permet une révélation directe ou indirecte de l'hybridation et l'utilisation de différents fluorochromes au sein d'une même expérience. Cependant, elle reste coûteuse, car elle nécessite l'emploi de dispositifs assez lourds pour la lecture des longueurs émises et pour l'interprétation du signal.

La détection de l'hybridation peut également être réalisée en utilisant des marqueurs radioactifs. Toutefois, cette technique ne permet pas d'obtenir une définition satisfaisante lorsque l'on recherche une miniaturiser les puces.

- 5 Une approche alternative consiste à utiliser les propriétés des matériaux semi-conducteurs. Par exemple, on peut choisir un support solide à base de silicium (Si) recouvert d'un diélectrique (SiO_2) sur lequel on fixe les sondes. Dans certaines conditions de polarisation adéquates, un courant, sensible aux modifications de charge du semi-conducteur, circule normalement de la source vers le drain. L'hybridation entre les sondes et l'ADN de l'échantillon entraîne une modification de la densité de charge du semi-conducteur à l'interface Si/ SiO_2 . Cette variation peut être mesurée et permet de détecter l'hybridation spécifique entre sondes et acides nucléiques cibles ; Souteyrand et al. (1995) Lettre des Sciences Chimiques 54, 9-11. Cette technique est utilisée par le laboratoire IFOS de l'Ecole Centrale de Lyon.
- 10
- 15 Une autre possibilité est l'utilisation de la puce développée par Bechman Instruments (Permittivity ChipsTM) qui bénéficie de la dispersion diélectrique due aux charges négatives des groupements phosphates présents dans le squelette nucléotidique. Ce phénomène, dépendant de la longueur de la molécule d'ADN, peut être quantifié par la fréquence de relaxation de la molécule. Cette grandeur varie en effet d'un facteur 100 lorsque la quantité d'ADN varie d'un facteur 10 ; Beattie K. et al (1993) Clin Chem 39 (4), 719-721. Dans cette technologie, on utilise un analyseur d'impédance pour mesurer l'énergie absorbée par les sondes lorsque celles-ci se trouvent appariées.
- 20
- 25 Les puces destinées à l'analyse de mutations doivent être capables d'analyser à l'aide de sondes chaque base d'une séquence déjà connue ou de détecter des mutations identifiées au préalable comme étant impliquées dans des maladies telles que le cancer.
- 30 Dans l'état de la technique, ces sondes sont décrites comme comprenant une partie homologue à la séquence de type sauvage et une modification (substitution, délétion,

- addition) localisée en milieu de séquence afin de standardiser les conditions d'hybridation. Dans le cas d'une analyse de substitution de base, les sondes sont organisées en tétrades, ensembles de quatre éléments dans lesquels une des sondes possède en position centrale la base homologue au nucléotide se trouvant dans la
- 5 séquence sauvage ; les trois autres sondes contenant les trois autres bases possibles. Cette analyse *in extenso* est décrite dans Chee M. et al. (1996) Science 274, 610-613. Selon cette technique, une puce à ADN a été mise au point pour détecter des mutations hétérozygotes dans le gène BRCA1 par mesure de la fluorescence. Ce système comporte environ 10^5 oligonucléotides permettant la détection de substitutions et
- 10 d'insertions de bases uniques, ainsi que des délétions longues de 1 à 5 nucléotides. Le système d'analyse des hybridations repose sur un marquage par deux couleurs (vert par la fluorescéine et rouge par une association phycoérythrine et streptavidine) ; Hacia JG et al. (1996) Nature Genet 14, 441-447.
- 15 Comme évoquée précédemment, la constitution des puces doit être améliorée car l'analyse des hybridations est rendue difficile par l'adressage photochimique qui produit des impuretés et par les variations de stabilité des hetéroduplex. De plus, les dispositifs actuellement disponibles dans le commerce sont relativement onéreux. Enfin, ce système est limité par le fait qu'une étape d'amplification des échantillons est
- 20 nécessaire si l'on veut obtenir un signal détectable. Une revue sur les puces à ADN est présentée dans Gramsey Graham « DNA Chips State of the Art » Nature Biotechnology vol. 16, Janvier 1998, dans Hinfray G. « Les puces à ADN » Biofutur, avril 1997 n°166, cahier n°91 et dans Marshall A. and Hodgson J. ; Nature Biotechnology vol. 16, Janvier 1998.
- 25 Dans le cadre de la présente invention, on a mis au point un système de puces à ADN qui repose sur l'hybridation spécifique de la sonde (servant dans le cas présent d'amorce oligonucléotidique) avec l'ADN cible, l'extension la sonde avec addition sélective d'au moins un dérivé d'oligonucléotide à l'extrémité 3' de l'amorce
- 30 complémentaire de l'ADN cible ; l'amorce ainsi allongée étant résistante à la digestion

par une exonucléase, en particulier par l'exonucléase III. On peut par exemple ajouter un α S-phosphothioatedésoxynucléotide grâce à une ADN polymérase ce qui empêche l'exonucléase III de digérer le duplex.

- 5 Ainsi, l'ADN reste présent en un site donné sur la puce seulement lorsque les conditions suivantes sont réunies :
- hybridation entre la sonde et l'ADN cible de l'échantillon, et
 - présence d'une base complémentaire dans l'ADN cible permettant l'incorporation du α S-phosphothioatedésoxynucléotide dans la sonde ; ce qui empêche sa
- 10 dégradation par la nucléase.

Dans le cas où la sonde ne s'hybride pas avec l'ADN cible, il y a élimination de la sonde en un site donné (micropuits ou autre). De même, si l'ADN cible ne contient pas la base complémentaire du α S-phosphothioatedésoxynucléotide donné, ce dernier n'est pas incorporé et la sonde est ensuite digérée par la nucléase.

On obtient ainsi des résultats simples à interpréter puisqu'ils sont seulement de deux types :

- ADN présent (1)
- 20 - ou ADN absent (0).

Cette technique associée avec un support solide électronique permet de mesurer la différence de charge, de conductance, de résistance, d'impédance ou tout autre effet de variation électrique, de variation d'effet de champ ou encore toute variation de masse entraînant une variation électrique (transducteur piézoélectrique) sur le support solide.

25 Par exemple, un tel support peut être un système semiconducteur, notamment un système ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor). Ce système capte donc des signaux simples 0 (pas d'ADN) ou 1 (ADN) du type binaire qui peuvent être directement transmis à un système de traitement de donné, notamment à un ordinateur.

Il est également possible de détecter la présence d'ADN en un site donné de la puce par lecture optique (modification des propriétés optiques du support telles que la réfraction, variation de la densité ou mesure de la fluorescence) par exemple en couplant le dispositif à une caméra CCD. Dans un tel système, les résultats sont faciles à interpréter car ils se résument à des résultats ADN présent (1) ou ADN absent (0) et tous les signaux entre 1 et 0 obtenus jusqu'à présent dans l'état de la technique sont éliminés.

Les avantages conséquents de ce système résident dans le fait qu'un signal simple est détecté sans avoir obligatoirement recours à des marqueurs, que la sensibilité de détection se trouve accrue, qu'il existe moins de risque d'obtenir des faux négatifs ou positifs et que l'interprétation des signaux ne nécessite pas d'algorithme excessivement compliqué. D'autres avantages apparaîtront ci-après dans la description détaillée de l'invention.

15

Ainsi, la présente invention se rapporte à un procédé de détection d'une mutation en position n dans un acide nucléique cible, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) hybridation d'une sonde liée en 5' à un support solide du type puce à ADN avec un acide nucléique cible, l'extrémité 3' de ladite sonde s'hybridant au maximum jusqu'au nucléotide n-1 de l'acide nucléique cible ,
- 20 b) elongation de la sonde hybridée à l'étape a) par incorporation dans la direction 5'-3' de nucléotides complémentaires dudit acide nucléique cible au moyen d'un mélange réactionnel comprenant au moins un dérivé de nucléotide résistant à la dégradation par une exonucléase et une ADN polymérase,
- c) digestion par ladite exonucléase de sorte que seules les sondes élongées à l'étape b) ne sont pas dégradées, lavage,
- 25 d) détection de la présence ou de l'absence de la mutation par mesure directe ou indirecte de la présence ou de l'absence d'ADN.

Les étapes clés de ce procédé sont illustrées dans l'exemple présenté à la figure 1 ci-après.

On entend par « ADN polymérase », tout enzyme naturel ou modifié ayant une activité polymérasique. On peut citer par exemple les ADN pol exo-, notamment la T7 ou le fragment de klenow.

On entend par « exonucléase » tout enzyme naturel ou modifié ayant une activité exonucléasique. On peut citer par exemple l'exonucléase III. On peut également envisager l'utilisation des ADN polymérase possédant une activité de pyrophosphorolyse (en présence d'une forte concentration en pyrophosphate, cet enzyme ajoute un pyrophosphate sur la dernière liaison phosphodiester et relâche donc le nucléotide en 3'). Ce produit est disponible chez Promega sous la marque READITTM, et des variants utilisant un système de révélation à la luciférase est disponible sous la marque READaseTM.

15

Lors de l'étape d), la présence ou l'absence de la mutation peut être mise en évidence, selon une premier mode de réalisation, par la mesure de la modification d'une propriété du support solide liée à la présence ou à l'absence d'ADN.

Une autre solution, consiste à détecter la présence ou l'absence de la mutation par lecture optique de la présence ou à l'absence d'ADN. On entend par lecture optique, toute mesure d'absorption, de transmission ou d'émission de lumière qui peut éventuellement se trouver à une longueur d'onde spécifique (260 nm par exemple) soit directement de l'ADN, soit de toute molécule marqueur liée à la sonde. Cette définition comprend également toute mesure de la fluorescence émise par des marqueurs (fluorescéine et/ou phycoérythrine).

On entend par « dérivé de nucléotides », tout analogue de nucléotides qui résiste à la dégradation par une nucléase. On peut citer par exemple les α S-phosphothioatedésoxynucléotides tels que α S-dATP, α S-dTTP, α S-dCTP, α S-dGTP,

α S-dUTP et α S-dITP. Ces dérivés de nucléotides peuvent être marqués notamment avec un marqueur fluorescent.

Une « sonde » se définit comme étant un fragment nucléotidique comprenant par exemple de 10 à 100 nucléotides, notamment de 15 à 35 nucléotides, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec un acide nucléique cible. Les sondes selon l'invention, qu'elles soient spécifiques ou non-spécifiques, peuvent être immobilisées, directement ou indirectement, sur un support solide et peuvent porter un agent marqueur permettant ou améliorant leur détection.

Bien entendu, la sonde sert d'amorce dans le cadre de l'invention puisque l'objectif est d'incorporer un nucléotide modifié en position n correspondant à la position de la mutation que l'on recherche. L'extrémité 3' de la sonde se termine donc au maximum et de préférence à n-1.

La sonde est immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, par exemple par covalence, par adsorption, ou par synthèse directe sur un support solide. Ces techniques sont notamment décrites dans la demande de brevet WO 92/10092.

La sonde peut être marquée au moyen d'un marqueur choisi par exemple parmi les isotopes radioactifs, des enzymes, en particulier des enzymes susceptibles d'agir sur un substrat chromogène, fluorogène ou luminescent (notamment une peroxydase ou une phosphatase alcaline) ou encore des enzymes produisant ou utilisant des protons (oxydase ou hydrolase); des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorogènes ou luminescents, des analogues de base nucléotidiques, et des ligands tels que la biotine. Le marquage des sondes selon l'invention est réalisé par des éléments sélectionnés parmi les ligands tels que la biotine, l'avidine, la streptavidine, la dioxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémiluminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents. Une autre possibilité est de marquer la sonde avec un peptide

comprenant un épitope reconnu par un anticorps donné. La présence de cet anticorps peut être révélée au moyen d'un second anticorps marqué.

- 5 Selon la première alternative évoquée ci-dessus, l'étape d) comporte la mesure d'une variation d'une caractéristique physico-chimique, électrique, optique ou mécanique du support solide notamment choisit parmi la charge, le dopage, la conductivité, la résistance, l'impédance ou tout autre effet de variation électrique, de l'effet de champ ou encore toute variation de masse entraînant une variation de champ, de la fréquence de résonance ou de l'admittance électroacoustique.
- 10 En ce sens, le support solide consiste en une puce à ADN qui peut comporter un matériau sélectionné parmi les semiconducteurs, les diélectriques et les transducteurs piézo-électriques ou une structure or-prisme. On peut donc retrouver donc une structure de base du type Si/SiO², des structures du type Métal-Oxyde-Semiconducteur (MOS), de préférence Electrolyte-Oxyde-Semiconducteur (EOS). De telles structures sont décrites Jaffrezic-Renault N. ISFET-ENFET, Microcapteurs et Microtechniques 225-235. En résumé, il s'agit de transistors à effet de champ (FET), notamment des transistors du type ISFET ou de préférence ENFET (Enzymatic Field Effect Transistor). Dans le cas d'un support ENFET, il peut être avantageux de lier à la sonde des enzymes de types hydrolases ou oxydases qui consomment ou produisent 15 des protons. On rajoute un substrat de ces enzymes et on mesure la variation de pH. Parmi les molécules permettant d'améliorer et/ou de simplifier la détection, un groupe contenant un atome métallique peut être greffé sur les sondes, notamment un groupe ferrocène.
- 20 Par mesure d'une modification des propriétés optiques du support, on entend toute 25 mesure de la variation d'une propriété optique du support solide liée à la présence ou à l'absence d'ADN sur ledit support. On peut citer par exemple la technologie de la société Biacore qui est notamment décrite dans WO 97/38132. Ce mode de réalisation de l'invention comprend donc la mesure d'indice de réfraction du support. On peut mesurer par cette technique la réflexion interne et externe, par exemple de 30 l'ellipsométrie, des ondes évanescentes comprenant la mesure de la SPR (surface

plasmon resonance), de l'angle de réfraction de Brewster, de l'angle critique de réflexion, de la FTR (frustrated total reflection), ou la STIR (scattered total internal reflection). Ces analyses peuvent être réalisées au moyen du Biacore 3000TM.

- 5 Conformément à la deuxième possibilité évoquée précédemment, l'étape d) consiste à mesurer la quantité de lumière transmise, absorbée ou émise. Dans ce cas, le support est fait d'un matériau transparent, notamment du verre. Les techniques d'accrochage des sondes sur le verre sont bien connues de l'homme du métier. On peut par exemple mesurer la fluorescence des sondes préalablement marquées et effectuer la lecture optique avec une caméra CCD.
- 10

Dans un mode préféré de réalisation, un α S-phosphothioatedésoxynucléotide tel que α S-dATP, α S-dTTP, α S-dCTP, α S-dGTP, α S-dUTP ou α S-dITP est incorporé à l'extrémité 3' de la sonde.

- 15 Cela peut s'effectuer par exemple par LCR, ou de préférence par PCR asymétrique, la sonde servant alors d'amorce étant dans chaque cas couplée chimiquement à son extrémité 5' à la phase solide en un site prédéterminé. Les α S-phosphothioatedésoxynucléotides peuvent être aisément incorporés dans des polynucléotides par toutes les polymérases et transcriptases inverses testées, ce qui permet d'utiliser des ADN polymérases d'un prix de revient plus avantageux que dans d'autres détections de mutations.
- 20

La fixation préalable des sondes en un site déterminé sur la puce peut être réalisée par les techniques d'adressage microfluidique développée par la société Orchid ou photochimique de la société Affimétrix ou encore d'electroadressage par Cis-Bio international, lesdites techniques étant à la portée de l'homme du métier.

25

- Selon l'invention, l'ADN cible est hybridé avec une sonde de manière à ce que son extrémité 3' se termine immédiatement avant le nucléotide à identifier. Un α S-phosphothioatedésoxynucléotide est rajouté à l'extrémité 3' de la sonde au moyen d'une ADN polymérase et est par conséquent complémentaire du nucléotide à identifier.
- 30

L'étape b) peut être réalisée parallèlement sur 4 sites (en tétrades) pour chaque sonde, avec addition d'un mélange réactionnel comprenant un α S-phosphothioatedésoxynucléotide différent par site. Il est ainsi possible de détecter une 5 mutation en une position donnée de l'ADN cible quelque soit la nature de la substitution de base. Concernant la digestion de l'ADN à l'étape c), on peut avantageusement utiliser l'exonucléase III.

Le procédé selon l'invention est particulièrement destiné à la détection de mutations 10 dans des gènes impliquées dans des maladies. On peut notamment citer les maladies génétiques héréditaires, en particulier l'hémochromatose, l'anémie à hématies falciformes, les β et α thalassemies, la fibrose kystique, l'hémophilie, et des mutations dans les gènes impliqués dans le cancer, par exemple dans les gènes Ras, p53, BRCA1. Une liste exhaustive des mutations dans ces gènes est donné sur le site internet 15 suivant : <ftp://ncbi.nlm.nih.gov/repository/OMIM/morbidmap>
En outre, le procédé selon l'invention est utile lors de l'étude du polymorphisme des gènes ou de toute région génétique et pour la détection et/ou l'identification d'organismes génétiquement modifiés (OGM).

20 Un autre aspect de l'invention porte sur un dispositif permettant de mettre en œuvre le procédé tel que décrit ci-dessus. Un tel procédé peut comprendre un système de détection de la présence ou de l'absence d'ADN en un site donné d'une puce, notamment un transducteur piezo-électrique, un transducteur à effet de champ, un lecteur de densité optique ou de fluorescence. Il peut être couplé à système de 25 traitement de données, notamment à un ordinateur.

Un autre aspect de l'invention concerne un kit comprenant une puce à ADN sur laquelle sont fixées des sondes et au moins un des éléments choisis parmi :

- un lot de 4 mélanges réactionnels comportant chacun un α S-phosphothioatedésoxynucléotide différent sélectionné parmi α S-dATP, α S-dTTP, α S-dCTP et α S-dGTP,
- une ADN polymérase,
- 5 - une exonucléase, en particulier l'exonucléase III,
- un lot de solutions pour solubiliser l'ADN polymérase et/ou l'exonucléase dans le cas où ces enzymes se présentent sous la forme de poudre lyophilisée.

Avantageusement, les puces de ce kit comportent un support solide du type ISFET, ENFET.

10

Ce kit est destiné à la détection de mutations de gènes impliquées dans des maladies, notamment dans des maladies génétiques héréditaires et dans le cancer. Il peut également servir pour le typage génétique et l'étude du polymorphisme des gènes (pour la détection de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisme)) et pour la détection 15 et/ou l'identification d'organismes génétiquement modifiés (OGM).

Légendes des figures

- 20 **Figure 1 : représentation schématique d'un mode particulier de mise en œuvre procédé selon l'invention.**
- a) hybridation d'une sonde liée en 5' à un support solide du type puce à ADN avec un acide nucléique cible, l'extrémité 3' de ladite sonde s'hybridant jusqu'au nucléotide n-1 de l'acide nucléique cible,
 - b) incorporation dans la direction 5'-3' d'un α S-dATP
 - 25 c) digestion par l'exonucléase III de sorte que seules les sondes élongées à l'étape b) ne sont pas dégradées et lavage,
 - d) détection de la présence ou de l'absence de la mutation par mesure directe ou indirecte de la présence ou de l'absence d'ADN.

Figure 2 : structure classique d'un support du type Métal-Oxyde-Semiconducteur (MOS).

Schémas tirés de Jaffrezic-Renault.

5 **Figure 3 : structures du type IFSET.**

A- IFSET tirée de Jaffrezic-Renault

B- DNAFET

Figure 4 : principe des puces selon l'invention avec une série de tétrades pour la

10 **détection de mutations dans le gène de l'hémochromatose.**

Exemple 1 : mode de réalisation particulier de l'invention

L'ADN cible comportant un fragment d'ADN qui contient une mutation T→G en
15 position n à identifier, est ajouté à la surface de la puce. Ledit fragment d'ADN s'hybride à la sonde oligonucléotidique complémentaire marquée au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) immobilisée en un site défini sur le support de la puce. Lors de la réaction subséquente avec la polymérase, un phosphothioatedésoxynucléotide (α SdATP) incorporé se trouve en position
20 complémentaire par rapport au nucléotide T en position n. Si le phosphothioatedésoxynucléotide qui se trouve dans le mélange réactionnel n'est pas complémentaire du nucléotide à identifier (différent de α SdATP), la sonde n'est pas prolongée en 3'. L'exonucléase III dégrade ensuite toutes les sondes qui n'ont pas été prolongées par un phosphothioatedésoxynucléotide. On réalise ensuite la détection par
25 la liaison d'un conjugué anti-FITC conjugué à la peroxydase. Une fois effectuée la réaction enzyme-substrat, un fort signal de mesure indique donc si le nucléotide à identifier (T) est complémentaire du phosphothioatedésoxynucléotide (α SdATP) qui a été ajouté au mélange réactionnel pour la réaction avec la polymérase.

Exemple 2 : Utilisation d'un support de type ISFET ou ENFET (Jaffrezic-Renault N., Microcapteurs et Microtechniques 225-235).

5

La figure 3A (tirée de Jaffrezic-Renault) représente schématiquement la structure ISFET. Celle-ci dérive de la structure MOSFET (voir figure 2 ; Jaffrezic-Renault) en ce sens que la grille métallique est remplacée par les électrolytes et l'électrode de référence.

- 10 L'expression de la tension de seuil est : $V_T = W_{sc} - W_{ref} + \phi_0 - (Q_s + Q_F)/C_i - 2\phi_b$. V_T est fonction des caractéristique chimique de la solution (ϕ_0 est la différence de potentiel entre la membrane sensible et la solution). Dans le circuit présenté à la figure 3A, le courant de drain est maintenu constant et on mesure la variation de tension V_G qui est proportionnel à ϕ_0 .
- 15 La membrane sensible au pH consiste en des couches minces de Al_2O_3 , Ta_2O_5 , Si_3N_4 . D'autres membranes sensibles aux ions K^+ , Na^+ , Ag^+ , F^- , Br^- , I^- , Ca_2^+ et NO_3^- sont également disponibles.

20 Dans le cadre de l'invention, on peut fixer sur le support les sondes marquées avec un enzyme qui produit des protons, système ENFET (Figure 3B). On obtient ainsi, une mesure de la présence ou de l'absence de l'ADN sur le support suite à la digestion par l'exonucléase III via une mesure de la variation du pH de la solution se traduisant directement par une variation de la tension V_T . Ce système peut éventuellement être couplé à un ou plusieurs amplificateur(s). La variation de tension dénote donc de la 25 présence d'ADN. Le système peut être conçu de manière à ce qu'une variation seuil de tension provoque ou non la passage du courant par une série d'amplificateurs et de transistors et donne in fine un signal de type binaire :

- (1) variation de la tension supérieure ou égale au seuil du transistor (ADN présent et mutation détectée),
- 30 (0) variation inférieure au seuil du transistor (ADN absent et donc pas de mutation).

Ces résultats peuvent ensuite être importés dans un système de traitement de données afin de compiler les résultats obtenus pour chaque site donné sur la puce.

5 **Exemple 3 : Utilisation d'un support solide du type transducteurs piézo-électrique.**

10 Certains matériaux tels que SiO₂, TiO₃Ba, LiNbO₃ et les polymères piézo-électrique (PVF2) ont la propriété de se déformer lorsqu'une contrainte physique est appliquée ; Perrot H. et Hoummady M., Transducteurs piézo-électrique. Il apparaît alors un potentiel électrique mesurable du à la pression exercée par la masse des molécules d'ADN. Cette mesure peut être la fréquence de résonance ou l'admittance autour de la fréquence de résonance. Dans le cas de la présente invention, l'ADN se trouve en milieu liquide. Dès lors, on peut également mesurer l'admittance électroacoustique ou la conductivité qui dépend notamment de la densité et de la viscosité de la solution contenant les électrolytes. On peu ainsi détecter une différence de 100 pg en milieu liquide.

15

20 **Exemple 4 : Utilisation du procédé selon l'invention pour la détection de mutations ponctuelles impliquées dans l'hémochromatose.**

Les mutations ponctuelles désignées HHP-1, HHP-19 et HHP-29 dans US 5,753,438 peuvent être détecter au moyen du procédé selon l'invention en utilisant une sonde dont l'extémité 3' se termine à n-1 de la position de la mutation :

HHP-1 :

25 **séquence normale**

5' TCTTTTCAGAGCCACTCACG₆₄CTTCCAGAGAAAGAGCCT 3' (SEQ ID N° 1)
séquence mutée AG64

5' TCTTTTCAGAGCCACTCAC_{A64}CTTCCAGAGAAAGAGCCT 3' (SEQ ID N° 2).

On utilise donc une sonde de séquence 5' AGAAAAAGTCTCGGTGAGTG₆₃ 3' (SEQ ID N°3) accroché en 4 sites prédéfini de la puce (site A, T, G, C). Sur le site où on applique le mélange réactionnel comprenant α S-dTTP (site T), on obtient un signal dans le cas où il y a effectivement mutation dans l'ADN provenant de l'échantillon.

- 5 Sur les autres sites A, G, et C , aucun signal n'est obtenu puisque l'ADN est digéré par l'exonucléase III.

Pour HHP-19 (A→G), on peut utiliser la sonde suivante :

5'TATATAGATATTAGATATAAAGAA3' (SEQ ID N°4)

- 10 Pour HHP-29 (A→G), on peut utiliser la sonde suivante :
5'AACCCCTAAAATATCTAAAAT3' (SEQ ID N°5)

On peut également détecter la mutation H63D, qui est due au remplacement d'une cystéine par une guanine sur le brin sens, avec les sondes SED ID N°6 et N°7.

On peut également détecter la mutation C282Y, qui est due au remplacement d'une guanine par une adénine sur le brin sens, avec les sondes SED ID N°8 et N°9.

Les quatre oligonucléotides SED ID N°6 à 9 peuvent être utilisés pour l'identification du nucléotide qui se trouve immédiatement après l'extrémité 3'de ces oligonucléotides. On peut prévoir à cet effet un système en tétrade (voir figure 4).

Exemple 5 : détection de mutations dans des gènes impliqués dans le cancer.**a) Mutations dans le gène MLH1 EST liées à l'apparition du cancer colorectal.**

5 Il existe à ce jour 60 mutations ponctuelles identifiées dans MLH1 comme étant impliquées dans le cancer colorectal ; Bronner (1994) Nature 368, 258, Papadopoulos (1994) Science 263, 1625.

On peut citer par exemple les mutations suivantes :

	Accession	Codon	Nucleotide	acide aminé
10	CM950799	62	CAA-TAA	Gln-Term
	CM960964	107	ATA-AGA	Ile-Arg

La liste complète est donnée online à www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/ns/1/249617.html.

Au vu du nombre importants de mutations pour un même gène, le procédé de détection selon l'invention avec une puce comportant des sondes spécifiques pour chacune des 15 mutations précitées apparaît donc indispensable pour garantir à un patient un diagnostic exact.

b) Détection de mutations dans le gène K-ras.

WO 91/13075 présente des sondes permettant de détecter des mutations ponctuelles 20 dans le codon 12 de K-ras. Dans le cadre de l'invention, on peut greffé sur la puce les sondes suivantes et dès lors garantir une détection complète de toutes les mutations possibles :

- 5' AAGGCAC TCTGCCTACGCCA 3' (SEQ ID N°10)
- 5' AGGCAC TCTGCCTACGCCAC 3' (SEQ ID N°11)
- 25 - 5' AACTTGTGGTAGTTGGAGCT 3' (SEQ ID N°12)
- 5' ACTTTGTGGTAGTTGGAGCTG 3' (SEQ ID N°13)
- 5' ACTGGTGGTGGTTGGAGCAG 3' (SEQ ID N°14)

Exemple 6 :**1) Objectif**

5

Ce travail a pour objectif la détermination du polymorphisme génétique d'un ADN grâce à l'utilisation d'une nouvelle technique de biopuce.

Cette technique consiste en l'amplification génique d'intérêt, l'hybridation des produits d'amplification obtenus sur un support solide (substrat) préalablement préparé par 10 fixation d'une sonde de façon covalente, extension de la sonde avec un nucléotide modifié, révélation de la dégradation ou de la protection de la sonde.

Ce protocole ci-dessous décrit est appliqué à la détermination du génotype C282Y et H63D du gène de l'hémochromatose.

15

2) Protocole**a) Préparation de l'ADN**

20 PCR avec amorces pour amplifier région génomique d'intérêt correspondant au génotype C282Y et H63D.

Séquence des amorces utilisées :

25 C282Y For : gggCTggATAACCTTggCT (SEQ ID N°15)
C282Y Rev : gTCACATACCCCAgATCACA (SEQ ID N°16)
H63D For : CCTTggTCTTCCTTgTTTgA (SEQ ID N°17)
H63D Rev : TCTggCTTgAAATTCTACTgg (SEQ ID N°18)

Ces amorces sont modifiées à leur extrémité 5' avec l'ajout d'un marqueur fluorescent Cy3 (Amersham)

La taille des fragments d'amplification attendue dans chaque cas est d'environ 100 pb

- 5 Les amplifications obtenues sont vérifiées sur gel d'agarose 1,5%

Les sondes utilisées pour C282Y et H63D sont celles décrites dans l'exemple 4: deux sondes pour chaque génotype à déterminer.

10 **b) Préparation des supports solides**

Les sondes sont fixées suite à une modification chimique de la surface permettant la réactivité de l' extrémités 5' des oligonucléotides sondes.

Pour chaque génotype à déterminer, 2 sondes sont dessinées permettant l'hybridation

- 15 des brins sens et anti-sens de l'amplification, et positionnées juste en amont de la base à révéler.

voir description Exemple 4.

c) Hybridation sur les puces

20

1 Dilution des amplifications volume:volume avec du TE 1X

2 Dénaturation des PCR 100°C pendant 5 min puis déposés dans la glace 1 min

3 Hybridation des PCR:

- Produits d'amplification dilués dans un tampon d'hybridation (SSC 5X, Denhardt 25 1X)
- Dépôt sur le substrat de silicium de la PCR
- Les substrats sont placés en chambre humide dans une boîte de Pétri à 37°C pendant 45 min sous 300 rpm
- Lavages avec SSC 5X .

4 Détection du polymorphisme:**a)- Elongation avec le dGTP uniquement**

Mix réalisé pour chaque puce :

Bst pol 8U/ μ l (Biolabs): 0,8 μ l (soit 0,016 U/ μ l)

5

Tampon Bst pol 10 X (Biolabs): 40 μ l

alphaThiodGTP (Amersham) 1 mM : 4 μ l

Eau stérile: 355, 2 μ l

- Dépôt des 400 μ l de Mix sur chaque puce

10

- Incubation à 50°C 20 min sous 300 rpm

- Lavages avec SSC 5X

b)- Digestion

Mix réalisé pour les 3 puces

15

Eau stérile : 1350 μ l

Tampon Exo III 10 X (Biolabs): 150 μ l

Exo III 100U/ μ l (Biolabs): 0,3 μ l

- Dépôt des 400 μ l de Mix sur chaque puce

20

- Incubation à 37°C 10 min sous 300 rpm

- Lavages dans du PBS 0,1% Tween 20

d)- Révélation

25 La mesure de l'émission de fluorescence due à Cy3 est effectuée (lecture sur un scanner par exemple) sur chaque plot/puce.

3) Résultats

30 Un signal positif a été obtenu pour C282Y et H63D (résultats non présentés).

Pour les différents ADN testés, on observe une disparition de la fluorescence due à Cy3 dans 1 plots sur 2 pour les différents génotypes.

- 5 En conclusion, une dégradation de certaines sondes par l'Exo III est observée et cette dégradation n'est observée que pour les brins n'ayant pas incorporé le thiodGTP.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection d'une mutation en position n dans un acide nucléique cible,
5 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - a) hybridation d'une sonde liée en 5' à un support solide du type puce à ADN avec un acide nucléique cible, l'extrémité 3' de ladite sonde s'hybridant au maximum jusqu'au nucléotide n-1 de l'acide nucléique cible ,
 - b) élongation de la sonde hybride à l'étape a) par incorporation dans la direction 5'-3'
10 de nucléotides complémentaires dudit acide nucléique cible au moyen d'un mélange réactionnel comprenant au moins un dérivé de nucléotide résistant à la dégradation par une exonucléase et une ADN polymérase,
 - c) digestion par ladite exonucléase de sorte que seules les sondes élongées à l'étape b)
ne sont pas dégradées, lavage,
- 15 d) détection de la présence ou de l'absence de la mutation par mesure directe ou indirecte de la présence ou de l'absence d'ADN.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on détecte à l'étape d) la présence ou l'absence de la mutation par mesure de la modification d'une propriété du support solide liée à la présence ou à l'absence d'ADN.
20
3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on détecte à l'étape d) la présence ou l'absence de la mutation par lecture optique de la présence ou à l'absence d'ADN.
25
4. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que l'on mesure à l'étape d) une variation d'une caractéristique physico-chimique, électrique, optique ou mécanique du support solide notamment choisit parmi la charge, le dopage, la conductivité, la résistance, l'impédance ou tout autre effet de variation électrique, de l'effet de champ
30 ou encore toute variation de masse entraînant une variation de champ, de la fréquence

- de résonance, de l'admittance électroacoustique, de l'indice de réfraction du support notamment de l'ellipsométrie, des ondes évanescentes comprenant la mesure de la SPR (surface plasmon resonance), de l'angle de réfraction de Brewster, de l'angle critique de réflexion, de la FTR (frustrated total reflection), ou la STIR (scattered total internal reflection).
- 5
5. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que le support solide consiste en une puce à ADN comprenant un matériau sélectionné parmi les semiconducteurs, les diélectriques et les transducteurs piézo-électrique ou une structure or-prisme.
- 10
6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que le support solide comprend des structures du type Métal-Oxyde-Semiconducteur (MOS), de préférence Electrolyte-Oxyde-Semiconducteur (EOS).
- 15
7. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que le support solide comprend des transistors à effet de champ (FET), notamment des transistors du type ISFET ou ENFET.
- 20
8. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce qu'un groupe contenant un atome métallique est greffé sur les sondes, notamment un groupe ferrocène.
- 25
9. Procédé selon la revendication 3 caractérisé que ce que l'étape d) consiste à mesurer la quantité de lumière transmise à travers le support solide, ledit support étant fait d'un matériau transparent, notamment du verre.
10. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que l'étape d) consiste à mesurer la fluorescence des sondes préalablement marquées.
- 30
11. Procédé selon l'une des revendications 9 et 10 caractérisé en ce que la lecture optique est effectuée par une caméra CCD.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce qu'on utilise à l'étape b) un α S-phosphothioatedésoxynucléotide, de préférence α S-dATP, α S-dTTP, α S-dCTP, α S-dGTP, α S-dUTP ou α S-dITP.
- 5
13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12 caractérisé en ce qu'on utilise à l'étape c) l'exonucléase III.
- 10 14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisé en ce que l'étape b) est réalisée parallèlement sur 4 sites pour chaque sonde, avec addition d'un mélange réactionnel comprenant un α S-phosphothioatedésoxynucléotide différent par site.
- 15 15. Procédé selon l'une des revendications précédentes destiné à la détection de mutations de gènes impliquées dans des maladies, notamment dans des maladies génétiques héréditaires, en particulier l'hémochromatose, l'anémie à hématies falciformes, les β et α thalassemies, la fibrose kystique, l'hémophilie, et des mutations dans les gènes impliqués dans le cancer.
- 20 16. Procédé selon l'une des revendications précédentes destiné à l'étude du polymorphisme des gènes ou de toute région génétique.
17. Procédé selon l'une des revendications précédentes destiné à la détection et/ou à l'identification d'organismes génétiquement modifiés (OGM).
- 25 18. Dispositif permettant de mettre en œuvre le procédé selon l'une des revendications précédentes.
19. Dispositif selon la revendication 18 caractérisé en ce qu'il comprend un système de détection de la présence ou de l'absence d'ADN en un site donné d'une puce,

notamment un transducteur piezo-électrique, un transducteur à effet de champ, un lecteur de densité optique ou de fluorescence.

20. Kit comprenant une puce à ADN sur laquelle sont fixées des sondes et au moins un des éléments choisis parmi :

- un lot de 4 mélanges réactionnels comportant chacun un α S-phosphothioatedésoxynucléotide différent sélectionné parmi α S-dATP, α S-dTTP, α S-dCTP, α S-dGTP, α S-dUTP et α S-dITP,

- une ADN polymérase,

10 - une exonucléase, en particulier l'exonucléase III,

- un lot de solutions pour solubiliser l'ADN polymérase et/ou l'exonucléase dans le cas où ces enzymes se présentent sous la forme de poudre.

21. Kit selon la revendication 20 caractérisé en ce que les puces comportent un support solide du type ISFET, ENFET.

22. Kit selon l'une des revendications 20 et 21 caractérisé en ce qu'il est destiné à la détection de mutations de gènes impliquées dans des maladies, notamment dans des maladies génétiques héréditaires et dans le cancer.

20

23. Kit selon l'une des revendications 20 et 21 caractérisé en ce qu'il est destiné à la détection de SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).

24. Kit selon l'une des revendications 20 et 21 caractérisé en ce qu'il est destiné à la détection et/ou l'identification d'organismes génétiquement modifiés (OGM).

1 / 4

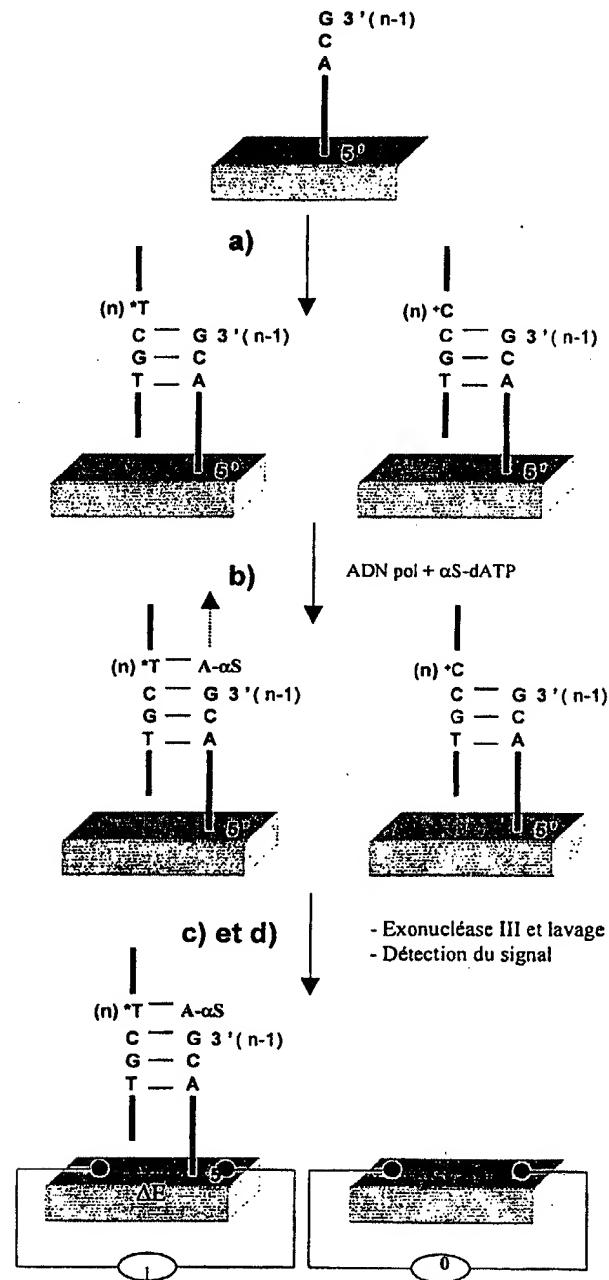


FIGURE 1

2 / 4

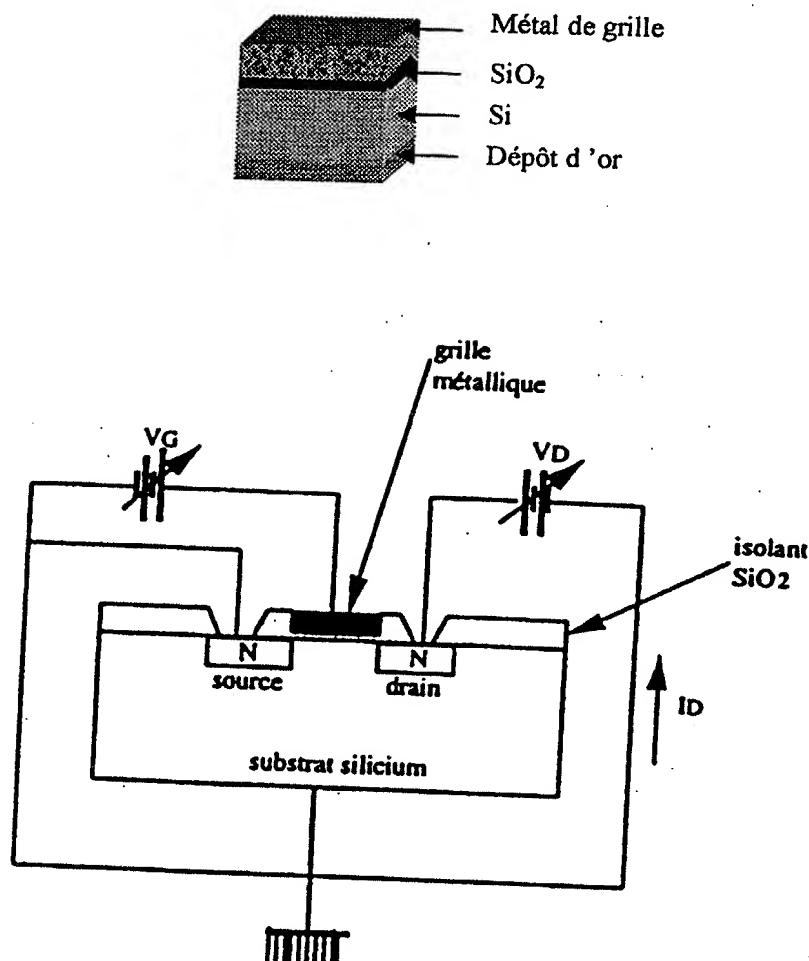


FIGURE 2

3 / 4

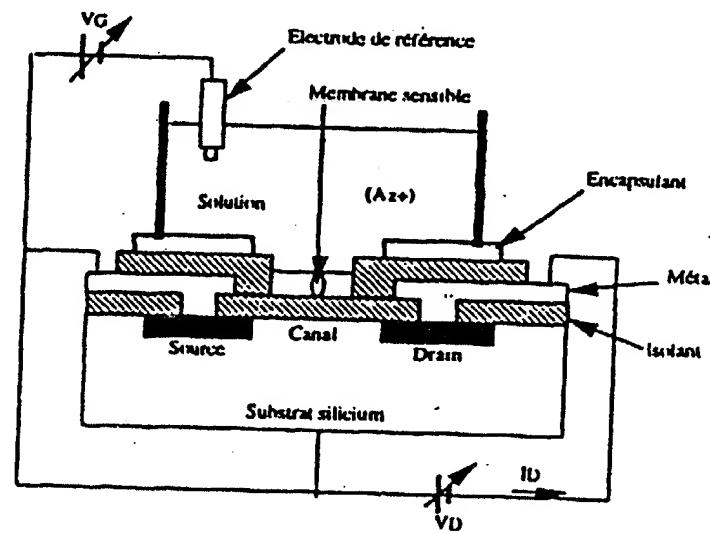


FIGURE 3A

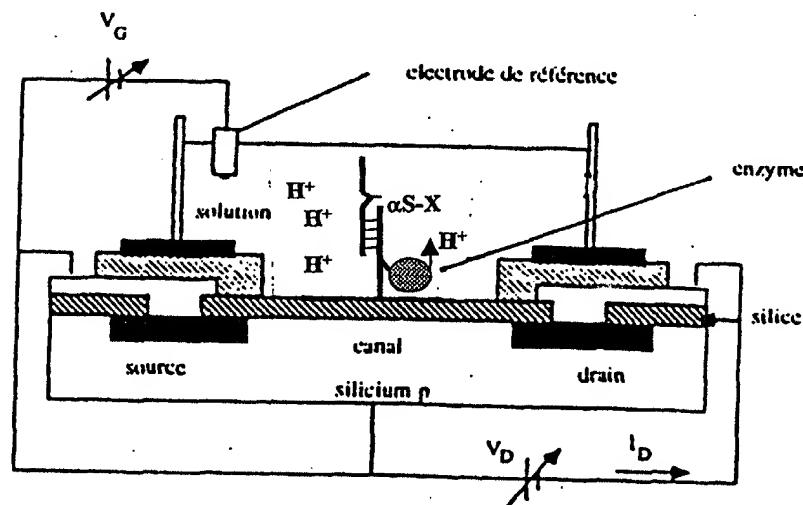


FIGURE 3B

4 / 4

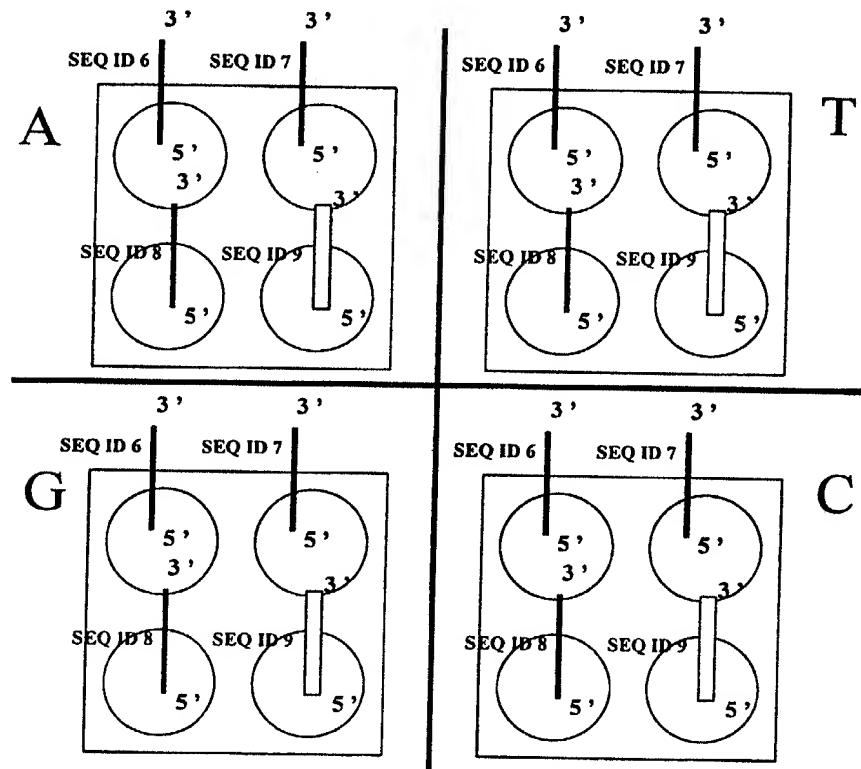


FIGURE 4

LISTE DE SÉQUENCES

<110> Nucleica

<120> Procédé de détection de mutations par puces à ADN.

<130> D18635

<150> FR 00 026 14
<151> 2000-03-01

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 38
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Séquence HHP-1 du gène HH normal.

<400> 1

tctttcaga gccactcacg cttccagaga aagagcct

38

<210> 2

<211> 38

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Séquence HHP-1 mutée en AG64.

<400> 2

tcttttcaga gccactcacca cttccagaga aagagcct

38

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Sonde de détection selon l'invention de HHP-1
AG64.

<400> 3

agaaaagtct cggtgagtg

19

<210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Sonde de détection selon l'invention de HHP-19
(A-->G).

<400> 4
tatatagata ttagatataa agaa 24

<210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde de détection selon l'invention de HHP-29
(A-->G).

<400> 5
aacccctaaa atatctaaaa t 21

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde de détection selon l'invention de H63D.

<400> 6
agctgttcgt gttctatgt 20

<210> 7
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde de détection selon l'invention de H63D.

<400> 7
actctcagcg gcacaccctc 19

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde de détection selon l'invention de C282Y.

<400> 8
ggaagagcag agatatacgt 20

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde de détection selon l'invention de C282Y.

3

<400> 9
ggtccacctc gtgggtccgg

20

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde selon l'invention de détection de mutations
dans le gène K-ras.

<400> 10
aaggcactct tgcctacgcc a

21

<210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde selon l'invention de détection de mutations
dans le gène K-ras.

<400> 11
aggcactctt gcctacgcca c

21

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde selon l'invention de détection de mutations
dans le gène K-ras.

<400> 12
aacttgtgg agttggagct

20

<210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde selon l'invention de détection de mutations
dans le gène K-ras.

<400> 13
acttttgtgg agttggagct g

21

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde selon l'invention de détection de mutations
dans le gène K-ras.

<400> 14
actgggttg gttggagcag

20

<210> 15
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> C282Y For

<400> 15
gggctggata accttggct

19

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> C282Y Rev

<400> 16
gtcacatacc ccagatcaca

20

<210> 17
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> H63D For

<400> 17
ccttggcttt tccttggttt a

21

<210> 18
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> H63D Rev

<400> 18
tctggcttga aattctactg g

21